昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, January 2008, 51(1): 91 – 95　　ISSN 0454-6296

小地老虎雄蛾对雌蛾性信息素的 EAG 反应

向玉勇[1], 杨茂发[1,*], 崔　巍[2], 娄永根[2], 唐　毅[1], 李子忠[1]

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳　550025; 2. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州　310029)

摘要: 利用触角电位记录(EAG)技术, 测定了小地老虎 *Agrotis ypsilon* (Rottemberg)雄蛾对性信息素标准化合物 Z7-12:Ac(A)、Z9-14:Ac(B)、Z11-16:Ac(C)、Z5-10:Ac(D)和 Z8-12:Ac(E)的 EAG 反应。结果表明 这些标准化合物均能引起 EAG 反应, 其中组分 A(Z7-12:Ac)引起的反应最强, 为 5.65 mV, 组分 B(Z9-14:Ac)和 C(Z11-16:Ac)居中; 组分 D(Z5-10:Ac)的 EAG 反应值最小, 为 2.50 mV。二元混合物、三元混合物、四元混合物和全组分的 EAG 反应较高, 其 EAG 反应值均显著高于单组分的反应值。三元混合物 ABC 的反应值最高, 与 5 头雌蛾腺体的正己烷浸提液的 EAG 值相当。在使用剂量为 0.01 ng ~ 100 μg 反应内, 小地老虎雄蛾触角对性信息素各组分及其混合物的剂量反应曲线大致呈'S'形。从不同日龄雄蛾对标准化合物的反应中, 发现在羽化后第 3 天达到最高值, 之后则随日龄增加 EAG 反应降低。

关键词: 小地老虎; 触角电位; 性信息素腺体浸提液; 标准化合物

中图分类号: Q965　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2008)01-0091-05

EAG response of the male black cutworm moth, *Agrotis ypsilon* (Rottemberg) (Lepidoptera: Noctuidae) to the female's sex pheromone

XIANG Yu-Yong[1], YANG Mao-Fa[1,*], CUI Wei[2], LOU Yong-Gen[2], TANG Yi[1], LI Zi-Zhong[1] (1. Key Laboratory for Plant Pest Management of Mountainous Region of Guizhou Province, Institute of Entomology of Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Insect Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The EAG responses of the male black cutworm moth, *Agrotis ypsilon* (Rottemberg) to standard chemicals of sex pheromone, *i.e.*, Z7-12:Ac (A), Z9-14:Ac (B), Z11-16:Ac (C), Z5-10:Ac (D) and Z8-12:Ac (E), were measured. The results showed that all the standard chemicals tested could elicit the EAG responses. Among the five components, component A (Z7-12:Ac) elicited the highest EAG response (5.65 mV), B (Z9-14:Ac) and C (Z11-16:Ac) elicited the second highest EAG, while D (Z5-10:Ac) elicited the lowest EAG (2.50 mV). The binary compounds, trinary compounds, four components compounds and full components compounds were also able to elicit higher EAG response, which were significantly higher than that of single component. The trinary compound ABC could elicit the highest EAG response, equal to that by the extracts of 5 female sex pheromone glands. The dose-response test of male antenna to each component and the compounds of sex pheromone took on the "S" type approximately with the increase of dose from 0.01 ng to 100 μg. From the response of male moths of different age to standard chemicals, we found that the response value reached the peak on the third day, and then reduced with the increase of age.

Key words: *Agrotis ypsilon*; electroantennogram; sex pheromone extracts; standard chemicals

小地老虎 *Agrotis ypsilon* (Rottemberg)是一种世界性的多食性农业害虫，可以危害 106 种作物幼苗(魏鸿钧等，1989)。其成虫具有很强的迁飞扩散能力，幼虫夜间活动、取食并具有假死习性，目前对

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字 2006-2048 号)

作者简介: 向玉勇, 男, 1974 年 6 月生, 湖南麻阳人, 博士研究生, 研究方向为昆虫化学生态学, 现在滁州学院化生系工作, E-mail: xyy10657@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: yangmaofa68@hotmail.com

收稿日期 Received: 2007-04-27; 接受日期 Accepted: 2007-11-12

生产上应用的各类常规化学农药已产生了较高的抗性。这些无疑给该虫的准确预测预报和有效防治造成困难，使近年来我国小地老虎的防治效果不尽人意。因此，开展对我国小地老虎性信息素的研究，并应用于生产实践中，具有重要的意义。

在鳞翅目昆虫中，发自雌蛾腹部腺体的性信息素特异地激活雄蛾触角上的毛形感器的感受细胞，并对雄虫有引诱和诱发性行为的作用。这种嗅觉机制可以通过触角电位(EAG)记录技术进行研究。触角电位技术自 Schneider (1957)发明并成功地应用于雄性家蚕触角对蚕醇去极化作用的测定以来，已成为研究昆虫嗅觉细胞必不可少的电生理手段，广泛应用于昆虫性信息素化合物的研究中。不仅如此，触角电位记录技术还成功地用于性信息素和寄主引诱物的鉴定过程。我们应用该技术，测定了小地老虎雄蛾对 5 种性信息素组分及其混合物的触角电位反应。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫及饲养方法

于 2006 年 3 月在贵阳市花溪区养牛村蔬菜基地采集小地老虎幼虫，在智能人工气候室(宁波江南仪器制造厂制造)中饲养多代。人工气候室光周期 14L∶10D、温度 25℃ ± 1℃、相对湿度 70% ± 7%。幼虫 3 龄前在罐头瓶(高度约 11 cm，直径约 7.5 cm)内小量群养，3 龄后单头饲养，并在罐头瓶内装约 5 cm 的沙壤土。用湿棉花包住菜叶叶柄饲养幼虫，每日更换叶片，罐头瓶口用套有纱布的橡皮筋固定住。幼虫化蛹后将纱布换成保鲜膜，保持土壤湿度。逐日检查羽化情况，把同日羽化的雌雄成虫分别放于同一养虫笼内，并喂以 10%的蔗糖水，待用。

1.2 性信息素标准化合物

Z7-12∶Ac、Z9-14∶Ac、Z11-16∶Ac、Z8-12∶Ac 和 Z5-10∶Ac 均购自美国 ISCA 公司，纯度经气相色谱检测大于 95%。各性信息素及其混合物溶液用重蒸的正己烷作溶剂配制而成，根据实验要求配成不同浓度的溶液，取 10 μL 滴加到 0.5 cm × 1.5 cm 滤纸上，装在不同的样品管中，空白样品管中加入与样品管等体积的正己烷。样品管两端开口，其中一端是磨口，连接气体分配装置，另一端对准触角，相距 1.5 cm 左右。

1.3 性信息素腺体浸提液

取 3 日龄处女雌蛾，在暗期开始后 6 ~ 7 h 制备性信息素腺体浸提液。用手轻轻挤压雌蛾腹部，迫使其伸出性信息素腺体，用手术剪剪下，置于滤纸上，压挤除去体液，放入自制微型玻璃管中(每管放 5 头腺体)，加入 10 μL 重蒸正己烷，用酒精灯封管。室温下静止浸提 30 min 后将腺体取出，浸提液用酒精灯封管后置入冰箱中低温(– 20℃)保存备用。

1.4 触角电位仪

触角电位测定仪由浙江大学昆虫科学研究所化学生态学实验室提供，由荷兰 Syntech 公司生产。包括微电极放大器，Syntech UN-06 直流交流放大器，Syntech CS-05 刺激放大器，Syntech Mp-12 微动操作仪，Syntech WILD M3Z 双目实体显微镜，Syntech 分析软件打印机打印输出记录结果。连续气体流量为 124 mL/min，刺激气体流量为 20 mL/min，刺激时间为 0.1 s，刺激间隔 30 ~ 60 s。电位仪工作条件为 :直流，增益为 200，测定电压范围为 1 mV。

1.5 EAG 测定方法

用眼科剪刀从触角基部剪下触角，并用单面刀片快速切下触角末端两节，用导电胶把触角的两端连接在玻璃电极上进行 EAG 测定。每根触角用每种性信息素化合物测定 2 ~ 3 次，共测试 6 根触角，取平行测定的平均值。不同化合物的刺激顺序是随机的，在剂量测定时，刺激顺序是从低浓度到高浓度。为了消除触角适应而导致的偏差，每测定 3 ~ 4 个样品后测一次空白(CK)。计算结果时，样品的反应值减去相邻空白 CK，得到触角对刺激物的净反应值。

1.5.1 小地老虎雄蛾对性信息素单组分及混合物的 EAG 反应：各性信息素单组分及其混合物溶液用重蒸的正己烷作溶剂配制而成。

1.5.2 小地老虎雄蛾蛾龄对 EAG 反应的影响：取同一批羽化的第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天、第 7 天的小地老虎雄蛾，用 10 μg/μL 各种标准化合物，测定其 EAG 活性。每一日龄小地老虎雄蛾重复测试 6 根触角。

1.5.3 小地老虎雄蛾对几种重要化合物的剂量-反应曲线：将性信息素化合物用正己烷配成一定浓度的溶液，在 HP-5890A 气相色谱仪上测定纯度，并检测含量，然后配成空白(CK)，0.01 ng，0.1 ng，1 ng，10 ng，100 ng，1 μg，10 μg，100 μg 的浓度系列，进行 EAG 测定(重复 6 根触角)，并分别绘制它们的剂量-反应曲线。

1.6 EAG

EAG 的大小通过测量 EAG 波形向下的峰值幅度获得。由 Syntech EAG 软件记录并存储。

2　结果与分析

2.1　小地老虎雄蛾对性信息素各组分及其混合物的 EAG 反应

小地老虎雄蛾触角对雌蛾性信息素各组分及其混合物的 EAG 反应生测结果见表 1。被测各单一组分及混合物的用量均为 10 μg，混合物中各组分间的重量比为 1∶1。性信息素分泌腺体浸提液均为 5 头雌蛾的量。单一组分中，A(Z7-12∶Ac)组分的反应值最高，为 5.65 mV，显著高于其他 4 个组分；B(Z9-14∶Ac)组分和 C(Z11-16∶Ac)组分居中；D(Z5-10∶Ac)组分的 EAG 反应值最小，为 2.50 mV。

二元混合物中，AC 和 AB 的 EAG 反应值最高，分别为 6.20 mV 和 6.06 mV，显著高于其他 8 个二元混合物；AD 的反应值稍低，为 5.94 mV；而其他 7 个二元混合物之间则差异不显著，其中 CE 的反应值最低，为 5.10 mV。

三元混合物、四元混合物和全组分混合物均可引起较强的 EAG 反应，其 EAG 反应值均显著高于单组分的反应值，与 5 头雌蛾腺体的正己烷浸提液的 EAG 值相当。

综合看来，所有测试的性信息素组分及其混合物中，虽然单一组分引起的 EAG 反应值较混合物为小，但都显著大于正己烷(0.62 mV)和空气(0.15 mV)对照。

表 1　小地老虎雄蛾对雌蛾性信息素组分的 EAG 反应

Table 1　EAG responses of male moth of *Agrotis ypsilon* to female sex pheromone components

刺激物 Stimulators	编号 No.	EAG 反应值 (mV) EAG response	变化范围 (mV) Variation scopes	变异系数 (CV) Variation coefficient
A (Z7-12∶Ac)	1	5.65 ± 0.30 ef	5.25 – 6.09	0.05
B (Z9-14∶Ac)	2	3.94 ± 0.24 i	3.66 – 4.17	0.06
C (Z11-16∶Ac)	3	3.63 ± 0.67 i	3.03 – 4.91	0.18
D (Z5-10∶Ac)	4	2.50 ± 0.45 j	1.78 – 3.13	0.18
E (Z8-12∶Ac)	5	2.67 ± 0.10 j	2.53 – 2.83	0.04
AB	6	6.06 ± 0.26 cd	5.59 – 6.32	0.04
AC	7	6.20 ± 0.22 abcd	5.88 – 6.43	0.04
AD	8	5.94 ± 0.36 de	5.47 – 6.42	0.06
AE	9	5.62 ± 0.20 efg	5.46 – 6.01	0.04
BC	10	5.44 ± 0.16 fgh	5.26 – 5.66	0.03
BD	11	5.33 ± 0.15 fgh	5.11 – 5.51	0.03
BE	12	5.34 ± 0.37 fgh	5.00 – 6.01	0.07
CD	13	5.25 ± 0.48 fgh	4.99 – 6.21	0.09
CE	14	5.10 ± 0.21 h	4.79 – 5.34	0.04
DE	15	5.23 ± 0.48 gh	4.66 – 6.02	0.09
ABC	16	6.58 ± 0.36 a	6.28 – 7.26	0.05
ABD	17	6.46 ± 0.13 abc	6.31 – 6.65	0.02
ABE	18	6.38 ± 0.37 abc	6.00 – 7.01	0.06
ACD	19	6.44 ± 0.47 abc	6.08 – 7.33	0.07
ACE	20	6.32 ± 0.15 abcd	6.12 – 6.51	0.02
ADE	21	6.21 ± 0.16 abcd	5.99 – 6.34	0.03
BCD	22	6.09 ± 0.07 bcd	5.89 – 6.21	0.01
BCE	23	6.19 ± 0.43 abcd	5.79 – 7.01	0.07
BDE	24	6.15 ± 0.30 abcd	5.75 – 6.65	0.05
CDE	25	6.13 ± 0.16 abcd	5.85 – 6.35	0.03
ABCD	26	6.43 ± 0.33 abc	6.12 – 7.02	0.05
ABCE	27	6.48 ± 0.38 abc	6.15 – 7.12	0.06
ABDE	28	6.44 ± 0.10 ab	6.25 – 6.53	0.02
ACDE	29	6.41 ± 0.42 abc	6.10 – 7.21	0.07
BCDE	30	6.31 ± 0.39 abcd	6.00 – 7.10	0.06
ABCDE	31	6.42 ± 0.12 abc	6.22 – 6.57	0.02
性信息素腺体浸提液 Sex pheromone extracts	32	6.53 ± 0.36 ab	6.21 – 7.23	0.06
正己烷 Hexane (CK)	33	0.62 ± 0.33 k	0.25 – 1.09	0.06
空气 Air (CK)	34	0.15 ± 0.04 l	0.01 – 0.43	0.27

注：表中数据是平均值 ± 标准差，后面英文字母为 Duncan's 多重比较检验的结果。同列数据后不同字母表示差异达显著水平，否则不显著。

Notes: Data in the table are mean ± *SD*. The letters after them indicate the results of Duncan's multiple test. Values followed by different letters in the same column are significantly different at 0.05 level.

2.2 小地老虎雄蛾对几种重要化合物的剂量-反应曲线

小地老虎雄蛾触角对性信息素各组分及其混合物的剂量-反应曲线大致呈‘S’形（图略）。当使用剂量在 0.1 ng 以下时，其 EAG 值与正己烷对照间没有明显的差异；当剂量增加到 1 ng 时，EAG 反应有所增强，并达到显著水平；当剂量从 1 ng 增加到 100 ng 时，EAG 值随剂量的增加呈直线快速上升趋势；此后，随剂量的增高，EAG 反应的增加程度趋缓，当剂量增加到 10 μg 以上时，EAG 反应不再有显著的增加（表 2）。

表 2 小地老虎雄蛾对性信息素的剂量反应

Table 2 Dose-response of male moth of *Agrotis ypsilon* to sex pheromone

性信息素 Sex pheromone	EAG 反应 EAG response							
	0.01 ng	0.1 ng	1 ng	10 ng	100 ng	1 μg	10 μg	100 μg
Z7-12 ∶Ac	0.63 ± 0.15	0.69 ± 0.42	1.25 ± 0.11	3.69 ± 0.23	4.52 ± 0.19	5.13 ± 0.46	5.65 ± 0.30	5.84 ± 0.07
Z9-14 ∶Ac	0.60 ± 0.21	0.65 ± 0.24	1.16 ± 0.32	2.78 ± 0.14	3.25 ± 0.37	3.48 ± 0.38	3.94 ± 0.24	4.09 ± 0.13
Z11-16 ∶Ac	0.56 ± 0.33	0.62 ± 0.32	1.11 ± 0.13	2.57 ± 0.26	3.12 ± 0.24	3.36 ± 0.13	3.63 ± 0.67	3.7 ± 0.15
Z5-10 ∶Ac	0.61 ± 0.16	0.64 ± 0.43	0.75 ± 0.37	1.24 ± 0.18	2.21 ± 0.17	2.42 ± 0.52	2.50 ± 0.45	2.6 ± 0.11
Z8-12 ∶Ac	0.59 ± 0.38	0.62 ± 0.35	0.89 ± 0.12	1.33 ± 0.26	2.15 ± 0.16	2.49 ± 0.23	2.67 ± 0.10	2.69 ± 0.32
ABC	0.64 ± 0.22	0.71 ± 0.17	1.35 ± 0.45	3.76 ± 0.23	5.34 ± 0.25	5.96 ± 0.44	6.58 ± 0.36	6.66 ± 0.41
ABCDE	0.63 ± 0.10	0.79 ± 0.51	1.65 ± 0.25	3.88 ± 0.09	5.61 ± 0.44	6.14 ± 0.08	6.42 ± 0.12	6.51 ± 0.35

2.3 小地老虎雄蛾蛾龄对 EAG 反应的影响

小地老虎雄蛾在羽化后第 1 天就对性信息素各组分有反应，随着蛾龄的增加，EAG 反应值显著增大，到第 3 天达到最高峰，以后随着蛾龄增加，反应值又逐渐下降。到第 7 天时已下降到刚羽化时的水平（图 1）。

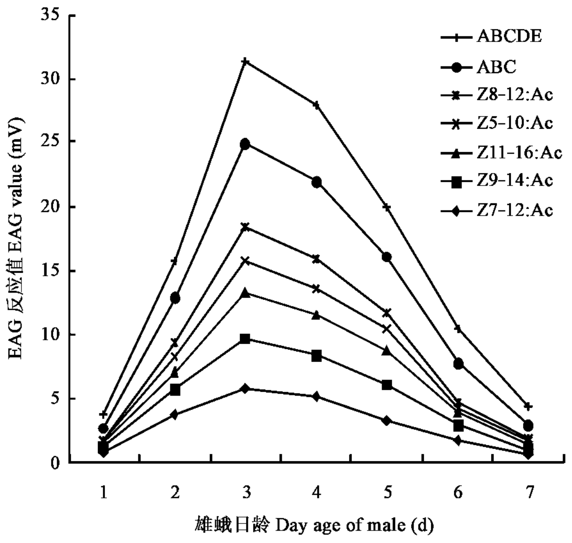

图 1 小地老虎雄蛾蛾龄对性信息素 EAG 反应的影响

Fig. 1 Effects of age on EAG responses of male moth of *Agrotis ypsilon* to female sex pheromone

3 讨论

本研究结果表明，小地老虎雌蛾的 5 种性信息素组分 Z7-12 ∶Ac、Z9-14 ∶Ac、Z11-16 ∶Ac、Z5-10 ∶Ac 和 Z8-12 ∶Ac 都可引起同种雄蛾的触角电位反应，且其反应的 EAG 值均显著高于空白对照，表明小地老虎雄蛾触角上具有这 5 种化合物的感受细胞。

在 5 种性信息素组分中，Z7-12 ∶Ac 的 EAG 反应最强，达到了 5 头雌蛾腺体浸提液的反应水平。因此，从 EAG 电生理的角度看，Z7-12 ∶Ac 是小地老虎性信息素多元组分中的主要功能组分，这与该组分在性信息素腺体浸提液中占有最大含量的结果也是一致的。三元混合物、四元混合物和全组分混合物可引起较强的 EAG 反应，其 EAG 反应值均显著高于单组分的反应值。由此，推测它们应具有较强的雄蛾引诱活性。进一步的风洞和田间生测结果（另文发表）证实了这一点。从结果看，几种组分的混合物产生的总体 EAG 反应并非是各个组分单独作用的 EAG 反应的简单叠加，这一点说明了小地老虎性信息素感受系统的复杂性。

小地老虎雄蛾在羽化后第 1 天对性信息素各单一组分和混合物的 EAG 反应值很低，到第 3 天达到最高峰，以后随着蛾龄增加，反应值又逐渐下降。因此，一般选择羽化后第 3 天的小地老虎作为供试虫源。小地老虎雄蛾的这种随日龄变化的 EAG 反应变化规律，与我们在室内所观测到的雌蛾随日龄变化的性信息素释放率的变化相符（另文发表）。这说明，小地老虎雄蛾触角上感受性信息素的感受器在羽化后第 3 天的 EAG 活性最高，以后 EAG 活性逐日降低。从我们室内观察来看，羽化后的第 3 天也是小地老虎交配的高峰期，由此可以推断小地老虎雄蛾和雌蛾同步达到性成熟。在许多昆虫中都发

现了日龄影响雄蛾触角上化学感受器活性的现象，一般随日龄增加 EAG 反应降低。汪新文等（1998）研究发现粘虫雄蛾随日龄增加对 Z11-16：Ald 的 EAG 反应先增加，在羽化后 5 ~ 7 天趋于稳定。目前对雄蛾触角外周感器的感受机制还了解得不很清楚，日龄相关的 EAG 反应降低可能是由于无效感器（inoperative sensilla）增多引起的。另外，神经体液机制影响感受器活性，从而影响 EAG 反应（Den *et al*.，1991）。

大多数鳞翅目昆虫雄蛾对性信息素的反应都有一个最低和最高阈值，剂量太小，诱芯的挥发率低，雄蛾不能感受到性信息素的气味，剂量太大，诱芯的挥发率过高，干扰了雄蛾对性信息素的识别能力。小地老虎雄蛾触角对性信息素各组分及其混合物的剂量反应曲线大致呈‘S’形。当使用剂量在 0.1 ng 以下时，其 EAG 值与正己烷对照间没有明显的差异；当剂量增加到 1 ng 时，EAG 反应有所增强，并达到显著水平；当剂量从 1 ng 增加到 100 ng 时，EAG 值随剂量的增加呈直线快速上升趋势；此后，随剂量的增高 EAG 反应的增加程度趋缓，当剂量增加到 10 μg 以上时，EAG 反应不再有显著的增加。说明雄蛾对性信息素的最佳反应剂量为 10 μg。所以在应用性信息素做‘仿真’诱芯时，应考虑剂量不是越高越好，应有一个最佳的剂量组成才能达到最佳的诱蛾效果。

EAG 反应测定的是触角上许多气味受体细胞产生的电位总和，其数值的大小只反映某一性信息素化合物所活化的感器受体数目的相对多少，而并不能以此断定该组分行为活性的大小。这是因为：第一，去极化作用的强弱不能区分信息化合物各级信号整合水平上，起抑制作用还是增效作用；第二，触角上数量少的感受细胞也可能控制某一个关键的行为反应（Howes *et al*.，1998）。因此 EAG 技术的最大用途在于对大量化合物的快速初筛。比较而言，单细胞记录技术能够提供哪一个化合物对哪一个（类）感受毛（细胞）起反应等更详细的信息；风洞行为生测可以详细观察雄蛾对雌蛾性信息素的各步行为反应，明确多元性信息素组分中各组分的行为功能；田间诱捕试验则对信息素活性的估价起决定性作用（Bellas and Bartell，1983），并可同时提供影响诱捕量的一些因子的重要信息（Carde and Hagaman，1979）。因此，对于昆虫性信息素及其他信号化合物的活性鉴定，EAG 技术作为简单有效的初筛手段，还应同其他生测技术相结合，以获得有关活性化合物更全面的信息和确定性的结论。

参 考 文 献（References）

Bellas TE，Bartell RJ，1983. Dose-response relationship for two components of the sex pheromone of light brown apple moth *Epiphyas postvitiana*. *Chem. Ecol*.，9：715－726.

Carde RT，Hagaman TE，1979. Behavioral responses of the gypsy moth in a wind tunnel to airborne enantiomers of disparlure. *Environ. Entomol*.，8：475－484.

Den CJ，Tchicaya OT，Schutte AM，1991. Effect of age，sex and hunger on the antennal olfactory sensitivity of tsetse flies. *Physiology Entomology*，16(2)：173－182.

Howes PE，Stevens IDR，Jones OT，1998. Insect Pheromones and Their Use in Pest Management. Chapman & Hall. 103－132.

Schneider D，1957. Electrophysiological investigations on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. *Experientia*，13：89－91.

Wang XW，Liu MY，Wu CH，1998. Electroantennogram of oriental armyworm *Mythimna separata* Walker exposed to sex pheromone. *Acta Entomol. Sin*.，41(1)：1－7. [汪新文，刘孟英，吴才宏，1998. 粘虫雄蛾触角对其性信息素的电生理反应. 昆虫学报，41(1)：1－7]

Wei HJ，Zhang ZL，Wang YC，1989. China Underground Pests. Shanghai：Shanghai Science and Technology Press. 276. [魏鸿钧，张昭良，王荫长，1989. 中国地下害虫. 上海：上海科学技术出版社. 276]

（责任编辑：黄玲巧）